

University of Groningen

Ecophysiological studies on bacterial degradation of chlorobenzoates

Krooneman, Janna

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1999

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Krooneman, J. (1999). Ecophysiological studies on bacterial degradation of chlorobenzoates. Groningen: s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Met name sinds het begin van de twintigste eeuw zijn veel milieuvreemde stoffen (xenobiotica) in de natuur terechtgekomen. Veel van deze stoffen, zoals herbiciden, fungiciden en insecticiden, zijn gebruikt als gewasbeschermingsmiddelen in de landbouw. Ook in de chemische industrie zijn veelvuldig oplosmiddelen, weekmakers, brandvertragers, schoonmaakmiddelen en dergelijke, al dan niet per ongeluk, in ons milieu terechtgekomen. Dergelijke milieuvreemde stoffen kunnen grote problemen in het milieu veroorzaken. Ze kunnen giftig zijn, waardoor planten, dieren en ook mensen er ziek van worden. Als deze verbindingen terechtkomen in het drinkwater, in de lucht die wij inademen, of in de bodem waar gewassen geteeld worden, zijn de gevolgen voor de volksgezondheid nauwelijks te overzien. Gelukkig is er de laatste jaren een groeiend besef, dat er grote gevaren op de loer liggen. De wetgeving is aangepast en chemisch afval mag niet zomaar meer geloosd worden. Ook zijn er allerlei technieken ontwikkeld die het mogelijk maken om "oude" vervuilingen op te ruimen. Voorbeelden hiervan zijn het afgraven van vervuilde terreinen, verbranding van chemisch afval bij extreem hoge temperaturen en langdurige opslag van zwaar slib. Een heel bijzondere techniek, in ieder geval gezien door de bril van een bioloog, is het biologisch reinigen van chemisch vervuild water, slib of grond, of chemisch vervuilde gassen.

Bacteriën blijken veel milieuvreemde stoffen (xenobiotica) af te kunnen breken. Dit is niet iets wat bacteriën zomaar doen; ze halen er energie uit, zodat ze zich kunnen vermenigvuldigen. In een niet vervuild milieu, komen ook stoffen voor met heel complexe structuren. Bacteriën zijn daardoor gewend aan het eten van complexe stoffen. Een probleem is echter dat xenobiotica vaak qua structuur net iets afwijken van in de natuur voorkomende verbindingen, doordat er bijvoorbeeld halogenen, zoals chloor- of fluoratomen, aan vast zitten. Hierdoor kunnen xenobiotica bestand zijn tegen biologische afbraak door bacteriën. Uit onderzoek is gebleken dat er vaak maar heel kleine aanpassingen nodig zijn in de afbraakroutes van bacteriën om ze xenobiotische stoffen toch te kunnen laten afbreken. Dit soort aanpassingen blijkt spontaan op te treden. Op plaatsen waar vervuilingen al geruime tijd aanwezig zijn, worden bacteriën gevonden die hun afbraakroute hebben aangepast waardoor ze in staat zijn de vervuilingen op te eten. Deze bacteriën kunnen zelfs vaak aanzienlijke hoeveelheden milieuvreemde stoffen eten, waardoor de vervuilde plek uiteindelijk weer schoon wordt. We spreken in zo'n geval van biologische reiniging of biosanering. In figuur 1 zijn een paar recente berichtgevingen uit de Nederlandse kranten betreffende biologische saneringen weergegeven. Een groot voordeel van biologisch reinigen van met name de bodem is, zowel praktisch als economisch gezien, dat deze niet hoeft te worden afgegraven. Als er een fabriek op staat, wat natuurlijk heel vaak het geval is, dan hoeft deze niet te worden afgebroken.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat vervuiling-etende bacteriën niet zomaar voor ons aan het werk gaan. Vaak hebben ze een voorkeur voor een bepaald dieet, een bepaalde temperatuur, of hebben ze zelfs behoefte aan zonlicht.

Door René Franssen

BREDA. De grond onder wasserij de Zout in Breda wordt sinds eind oktober gereinigd. Maar van buiten is daar niets van te zien. De wasserij draait gewoon door. Bacteriën breken de schadelijke chemicaliën af die in het verleden vanuit de wasserij in de bodem zijn geslopen. Een wereldprimeur in biologische grondreiniging.

In Nederland zijn ongeveer honderdduizend bedrijfsterreinen zo ernstig vervuild dat de bodem eigenlijk moet worden schoongemaakt. De klassieke saneringsmethode bestaat uit het afgraven van de grond, die dan vervolgens kan worden opgeslagen of verbrand. Om Nederland op deze manier giftig te maken is naar schatting 50 tot 150 miljard nodig, wat in schril contrast staat met de enkele honderden miljoen die per jaar beschikbaar zijn. Bovendien is afgraven van grond ingrijpend, denk aan de beelden van Leidsche Rijk waar een hele woonwijk moest worden ontruimd. Het zoeken is dus naar goedkopere en minder ingrijpende alternatieven.

Bij ongeveer een kwart van de vervuilde locaties gaat het niet om bij de Zout, om vervuiling met organische oplosmiddelen, zogeheten gechlorideerde koolwaterstoffen (GKW's). De werkgroep Microbiote Groningen heeft uitgeroepen dat deze GKW's door bacteriën kunnen worden afgebroken tot onschadelijke stoffen als koolstofdioxide en water. Het zijn maar weinig organismen die zo'n taak kunnen uitvoeren, al dus Jan Gortchual, de leider van het project. Volgens hem bestaat wel micro-organismen die de verontreinigingen te lijf kunnen. De kunst is om de condities in de grond optimaal te maken voor deze bijzondere organismen.

In het laatste nummer van de krant, 28 oktober, is het alweer.

Door onze redacteur

E.G. DE RUITER

BREDA, 28 OKT. Bij textielwasserij

De Zout in Breda is deze week

een proef op praktisch schaal be-

gonnen om met behulp van bacte-

riën een stuk grond te reinigen

dat in het verleden ernstig is ver-

vuild door chemicaliën. Het gaat

voornamelijk om perchloroethy-

len, de groep van gechlorideerde

koolwaterstoffen (GKW's). Bacte-

riën worden al langer toegepast

af te breken, nu dienen ze voor

het eerst als...

stijg word

per mid

ring zich

rokt. In

daarvoor

Groningse microbiolog

Bacteriën

Nederland begint zo langzamerhand

en grote vuilnisbelt te worden

even met zijn allen op n

sonderd- à twee

gronden. Oude

genzestations, (i. ZATERDAG 28 MAART 1998

plaatsen, gasfabri

vorult er een paar l

gilden uitgegeven a

an die terreinen. Dat

naar een grove schatting

schoonmaken van hee

rijftig à honderd miljard

kosten. Als we in dit te

gaan, zijn we nog een pa

ezig met opruimen.

De gifopruimers kunnen dus

hulp gebruiken. En al enige t

Moeder Natuur te trappelen t

zen handje te helpen. Haar ha

zijn namelijk prima schoonm

Niet alleen haar eigen afval ruims

op, bacteriën zijn al meermaals

staat gebleken ook het onnatuurlij

afval van de mens af te breken. Te

minste, in het laboratorium. In o

praktijk van de vervuilde bodem w

het nog niet echt lukken. De micro

biologische reiniging zou een oplos

sing zijn voor in elk geval tien proc

cent van de gifgronden, maar het

Minister f

het Natu

NMPP

and ga

vuilde

Nebu

veel v

vend

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

re

door René Franssen

BREDA - De grond onder wasserij de Zon in Breda wordt sinds eind oktober gereinigd. Maar van buiten is daar niets van te zien, en de wasserij draait gewoon door. Bacteriën breken de schadelijke chemicaliën af die in het verleden vanuit de wasserij in de bodem zijn gelepen. Een wereldprimeur in biologische grondreiniging.

In Nederland zijn ongeveer honderdduizend bedrijven en ondernemingen actief op de bodem. Dit is een groot probleem, want de bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

Groningse microbiologen testen reinigingstechniek onder Bredase wasserij

Bacteriën kunnen de was doen

Nederland begint zo langzamerhand met grote vuilnisbelt te worden. Het is een proces dat al jarenlang aan de gang is. Het is een proces dat al jarenlang aan de gang is. Het is een proces dat al jarenlang aan de gang is. Het is een proces dat al jarenlang aan de gang is.

Met hulp van bacteriën Opruimen gifgrond kan goedkoper

Door een water redacteur
Gouda, 28 MAART. Het schoonmaken van 170.000 gifk-

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

NRC

ZATERDAG 28 MAART 1998

Breda een bodemsaneringspro-
n Gronings idee gaan bacteriën
der een wasserij reinigen. Een
len de initiatiefnemers. Dat is
Alleen al de RUG heeft meer
bacteriën in huis.

Engels

proberen. En allemaal hebben ze een
soort Pokon gekregen, en natuurlijk
vat perchloorethyleen. Het is de be-
veling dat de schoonmakers bacte-
n die al van nature onder de wasse-
voorkomen, stimuleren.
die bacteriën weet je in elk ge-
at ze het er redelijk uithouden".
delijkt Gerritse. "Dat maakt
een stuk kansrijker dan
we vreemde bacteriën zou-

Minister De Boer (Milieu) heeft in
het Nationaal Milieubeleidsplan
(NMP) berekend dat honderd mil-
jard gulden nodig is om alle ver-
valde grond schoon te maken.
Nobis komt in zijn herkenningen
veel lager uit en veronderstelt
vervalde dat de mens veel minder
in te grijpen. Bacteriën in de
grond zelf al veel werk voor
niet meer exper-

Gif saneren kan sneller en goedkoper

De afvalstoffen van de industrie en de huishouding worden verbrand. Maar het be-
langrijkste nadeel is dat de grond
voor de volle honderd procent
vercont. Voor iedere soort
verconting moet er een andere
saneringsmethode worden toege-
past.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen. De bodem is de laatste plek waar de afvalstoffen van de industrie en de huishouding terecht komen.

Figuur 1: Recente mediaberichten uit diverse Nederlandse dagbladen over biologische saneringen.

Pas als de omstandigheden gunstig zijn voor bacteriën, gaan ze aan de slag. In een laboratorium kunnen deze omstandigheden nauwkeurig in de hand gehouden worden, zodat een bepaalde bacteriesoort een verbinding snel afbreekt. In de bodem is de situatie over het algemeen echter veel minder gunstig. Overal zitten kleine hoekjes en gaatjes waar lekkere 'bijgerechten' of andere groeifactoren verstopt zitten, de temperatuur is niet hoog genoeg, er is geen lucht, er zijn nog andere (voor de bacterie giftige) chemische afvalstoffen aanwezig, etc. Kortom, vaak is de heersende situatie in de bodem verre van ideaal. Tot op zekere hoogte kan er ingegrepen worden en kunnen de condities enigszins aangepast worden, bijvoorbeeld door het toedienen van extra voedingsstoffen, of het inpompen van lucht. Op deze manier kunnen de juiste bacteriën gestimuleerd worden om het vuile werk op te knappen. Een voorwaarde is uiteraard dat we weten welke factoren in de bodem van invloed zijn op juist die afbraakprocessen die we willen stimuleren. Om daar een goed beeld van te krijgen moet er eerst een stapje terug gedaan worden: van de vervuilde grond naar het laboratorium. In het laboratorium kunnen de bacteriën gekweekt worden en met behulp van chemische analysemethoden kunnen de afbraaksnelheden van de vervuilingen gevolgd worden. Door vervolgens veranderingen in de milieuomstandigheden van de bacterie aan te brengen (bijvoorbeeld door de kweek van het licht in het donker te zetten, of van een koude plaats op een warme, etc.) en de afbraaksnelheid wederom te meten, kan een beeld verkregen worden van de optimale groeiomstandigheden voor een bacteriesoort.

Dit proefschrift laat zo'n studie zien. De vraag die aan de basis ligt van dit proefschrift is hoe omgevingsfactoren de bacteriële afbraak van xenobiotica beïnvloeden. Er zijn echter vele typen xenobiotica die qua structuur heel verschillend zijn. Dit onderzoek beperkt zich daarom tot het bestuderen van de bacteriële afbraak van gehalogeneerde aromaten. Gehalogeneerde aromatische stoffen, zoals bijvoorbeeld gechloreerde benzenen, PCBs, chloor- en broomfenolen en dioxine-achtige stoffen, vertegenwoordigen een grote groep milieuvreemde verbindingen. Ze zijn opgebouwd uit een aromatische koolwaterstof ring, waaraan verschillende chemische groepen vast kunnen zitten, zoals chlooratomen, zuurgroepen ($-\text{COOH}$) of hydroxylgroepen ($-\text{OH}$). Als modelstof is gekozen voor gechloreerde benzoaten (Figuur 2).

Gechloreerde benzoaten kunnen op verschillende manieren door bacteriën worden afgebroken. Diverse omgevingsfactoren, zoals onder andere temperatuur, zuurtegraad, aan- of afwezigheid van lucht en zonlicht spelen hierbij een rol. In dit proefschrift staat zuurstof centraal. Zuurstof blijkt namelijk sterk bepalend voor het afbraakproces dat optreedt en welke bacteriën hierbij betrokken zijn. Zonder zuurstof zijn de processen volledig anders (anaërobe processen) dan wanneer er wel zuurstof aanwezig is (aërobe processen). Als een xenobiotische stof in de natuur terecht komt, komt deze stof in eerste instantie terecht in een laag waarin lucht doordringt (er is wel zuurstof). Vervolgens zal de stof, indien er geen (volledige) afbraak plaatsvindt, een schemergebied passeren waar soms wel en

soms geen zuurstof is. lagen, die volledig zuurstof schemergebied veel micro- uit naar dit schemergebied

Cl-

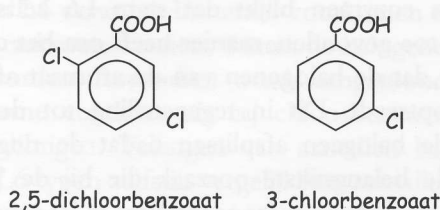
2,5-di-

Figuur 2: Chemische structuur

In het tweede hoofdstuk is gebleken dat dichloorbenzoaat (ring) wordt omgezet door bacteriën in dichlooratoom. Dit is een proces dat geldt: hoe meer halogeen, hoe sneller. Echter, volledige dechloratie is thermodynamisch ongunstig. Afbraak van deze stof kan alleen tot volledige afbraak door samenwerking vereist is. Het dichloorbenzoaat wordt omgezet worden door de eenvoudige oplossing, maar bacteriën zijn namelijk niet in staat. Het is dus van belang de leefomgeving uiterst laag te houden. Aërobe bacteriën blijken om tot een succesvolle afbraak dan kunnen reacties in de omgeving gevormd worden en de bijproducten kunnen zo de volledige afbraak van de stof wenselijk zijn om een laag zuurstofconcentraties, zodat "zuurstofspecialisten" waar hebben we zelf geprobeerd.

In het derde hoofdstuk

soms geen zuurstof is. Uiteindelijk zal de stof terecht komen in de anoxische lagen, die volledig zuurstofloos zijn. Uit onderzoek is gebleken dat er juist in het schemergebied veel microbiële activiteit is. In mijn proefschrift gaat alle aandacht uit naar dit schemergebied: het oxische/anoxische grensvlak.

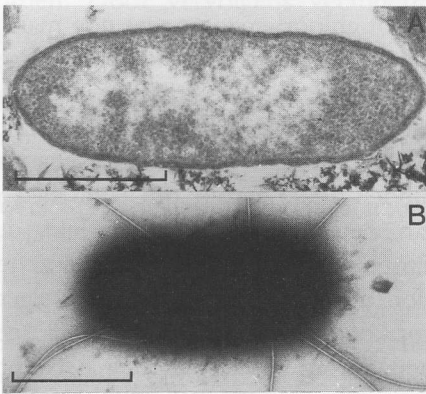


Figuur 2: Chemische structuren van 2,5-dichloorbenzooaat en 3-chloorbenzooaat

In het tweede hoofdstuk is een anaëroob proces beschreven. Uit het onderzoek is gebleken dat dichloorbenzooaat (er zitten twee chlooratomen aan de aromatische ring) wordt omgezet door anaërobe bacteriën tot chloorbenzooaat met nog maar 1 chlooratoom. Dit is een belangrijke en gewenste omzetting, omdat in het algemeen geldt: hoe meer halogenen er aan de verbinding zitten, hoe toxischer de stof. Echter, volledige dechlorering lukt niet onder zuurstofloze omstandigheden door thermodynamische oorzaken. Er is dus een restproduct: monochloorbenzooaat. Afbraak van deze stof kan heel goed plaatsvinden onder aërobe omstandigheden. Om tot volledige afbraak te komen van een dichloorbenzooaat lijkt dus samenwerking vereist tussen aërobe en anaërobe bacteriën. De anaëroben zetten het dichloorbenzooaat om tot een monochloorbenzooaat, en dit kan vervolgens omgezet worden door de aërobe bacteriën tot kooldioxide en water. Dit lijkt een eenvoudige oplossing, maar 't blijkt in de praktijk erg moeilijk te zijn. Anaërobe bacteriën zijn namelijk heel gevoelig voor zuurstof en kunnen er zelfs dood aan gaan. Het is dus van belang dat de zuurstofconcentraties in hun directe leefomgeving uiterst laag blijven. Ook omgekeerd blijkt er een groot probleem. Aërobe bacteriën blijken juist relatief hoge concentraties zuurstof nodig te hebben om tot een succesvolle afbraak te komen. Wordt de zuurstofconcentratie te laag, dan kunnen reacties in de stofwisseling fout lopen, waardoor giftige bijproducten gevormd worden en de stofwisseling als het ware 'verstopt' raakt. Deze bijproducten kunnen zo giftig zijn, dat ze de bacteriën kunnen doden. Om tot volledige afbraak van aromaten met meerdere halogenen te komen zou het dus wenselijk zijn om een aërobe bacterie, die wel goed kan groeien bij hele lage zuurstofconcentraties, samen te laten werken met een anaërobe. Deze "lage-zuurstofspecialisten" waren echter nog niet beschreven in de literatuur, en dus hebben we zelf geprobeerd de bacterie te vangen.

In het derde hoofdstuk beschrijven we een aërobe bacterie, *Alcaligenes* sp. stam

L6, die chloorbenzooat met hele lage zuurstofconcentraties goed kan omzetten. Deze bacterie is geïsoleerd uit een schep vervuild rivierslib, afkomstig uit de Dordtse Biesbosch. De eerste aanwijzingen dat dit organisme zich heeft aangepast aan lage zuurstofconcentraties bleken uit het feit dat er geen verstoppingen in de stofwisseling optreden en dat geen giftige bij- of tussenprodukten gevormd worden. Uit metingen aan enzymen blijkt dat stam L6 zelfs een ongewone, volledig anders dan tot nu toe gevonden, manier heeft om het chloorbenzooat af te breken. Karakteristiek is dat de halogenen van de aromaaf gesplitst worden, voordat er ring-splitsing optreedt. Dit in tegenstelling tot de in de literatuur beschreven aëroben, die de halogeen afsplitsen nadat de ring opengeknipt is. Vermoedelijk is dit ook de belangrijkste oorzaak die bij de 'gewone' aëroben verstoppingen veroorzaakt als de zuurstofconcentraties te laag worden. In figuur 3 zijn twee foto's te zien van stam L6. Deze foto's zijn gemaakt met behulp van elektronenmicroscopie en laten zien dat stam L6 een staafvormige bacterie is die zich kan voortbewegen door middel van flagellen (zweepstaartjes) die rondom de cel gesitueerd zijn.



Figuur 3: Electronen microscopische foto's van *Alcaligenes* sp. stam L6. A) De vorm van stam L6 is staafvormig en de grootte is ongeveer twee-en een halve micrometer bij een halve micrometer. B) Stam L6 is in staat zich voort te bewegen met behulp van flagellen (zweepstaartjes) die rondom de cel gesitueerd zijn.

Dan rijst natuurlijk de vraag of organismen zoals stam L6 in vergelijking tot de gewone aëroben wel snel genoeg zijn in het 'pakken' van het substraat. Dit is van belang om te voorkomen dat onder zuurstof-limiterende condities de laatstgenoemde groep aëroben hen een stapje voor is, en ongewenst de gehalogeneerde aromaten omzet in giftige tussenprodukten. Hiertoe zijn er competitie-experimenten gedaan (beschreven in het vierde hoofdstuk) waarin een "gewone" aërobe bacterie, *Pseudomonas* sp. stam A3, wedijvert met stam L6 in de afbraak van chloorbenzooat. Zowel bij lage zuurstofconcentraties als bij lage chloorbenzooatconcentraties bleek inderdaad stam L6 een specialist bij uitstek. Alleen als beide concentraties hoog zijn, blijkt stam A3 de competitie van stam L6 te winnen. Hierdoor zijn A3-achtige bacteriën wel uitermate geschikt om bijvoorbeeld in bioreactoren dergelijke chlooraromaten op te ruimen. Er kan dan

een hoge afbraaksnelheid bereikt worden, echter, waar zuurstof met een hoge type belangrijke afbrekende

In het vijfde hoofdstuk worden verschillende typen en varianten (niet-vervuild) aan L6 vergeleken met de ongewone afbraak van chloorbenzooat. De ring afgesplitst worden onder zuurstof-arme condities. Het winnen van A3-achtige bacteriën laten zien dat de L6-type aëroben. Dat dit nieuwe type aëroben vermoedelijk te wijten aan de uitvoering niet gunstig is.

Een andere groep organismen grensvlakken is de groep van microben kunnen zowel aerobisch als bovendien erg makkelijk in de afbraak van *Rhodospseudomonas palustris* (H) facultatief anaëroob (H) dat zonlicht gebruikt voor de afbraak. Het omzetten onder zuurstof-arme condities, of andere organische koolstofbronnen concurrent zijn voor de afbraak. Competitieproeven hebben aangetoond dat DCP3 de baas is. Alleen onder zuurstof-arme condities puur vanwege het feit dat het heeft de fototroof ook in staat is. Het is dus twijfelachtig of het is betreffende de biologische

In figuur 4 zijn de veranderingen in de zuurstofconcentratie

Wat kunnen we met de

Het is duidelijk dat de afbraak van benzoaten en de daarbinnen aan de omgevingscondities in een bioreactor gehalveerd hoe veelheden lucht door A3 de perfecte kandidaat

een hoge afbraaksnelheid van de vervuulende stoffen bereikt worden. In de bodem echter, waar zuurstof meestal de beperkende factor is, zullen bacteriën van het L6-type belangrijke afbrekers zijn.

In het vijfde hoofdstuk wordt beschreven dat in bodemmonsters van verschillende typen en van verschillende plekken (zand, klei, veen, vervuild, of niet-vervuild) aan L6 verwante bacteriën voorkomen en dat deze organismen ook de ongewone afbraakroute kennen, waarin de halogenen voor het knippen van de ring afgesplitst worden. Bovendien wordt aangetoond dat deze bacteriën zowel onder zuurstof-arme condities als bij chloorbenzooat-beperking de competitie winnen van A3-achtigen. Tellingen van aantallen bacteriën in bodemmonsters laten zien dat de L6-typen zelfs in vergelijkbare aantallen voorkomen als "gewone" aëroben. Dat dit nieuwe type bacterie niet eerder gevonden en beschreven is, is vermoedelijk te wijten aan het feit dat de omstandigheden waaronder isolaties zijn uitgevoerd niet gunstig genoeg waren voor dit bijzondere micro-organisme.

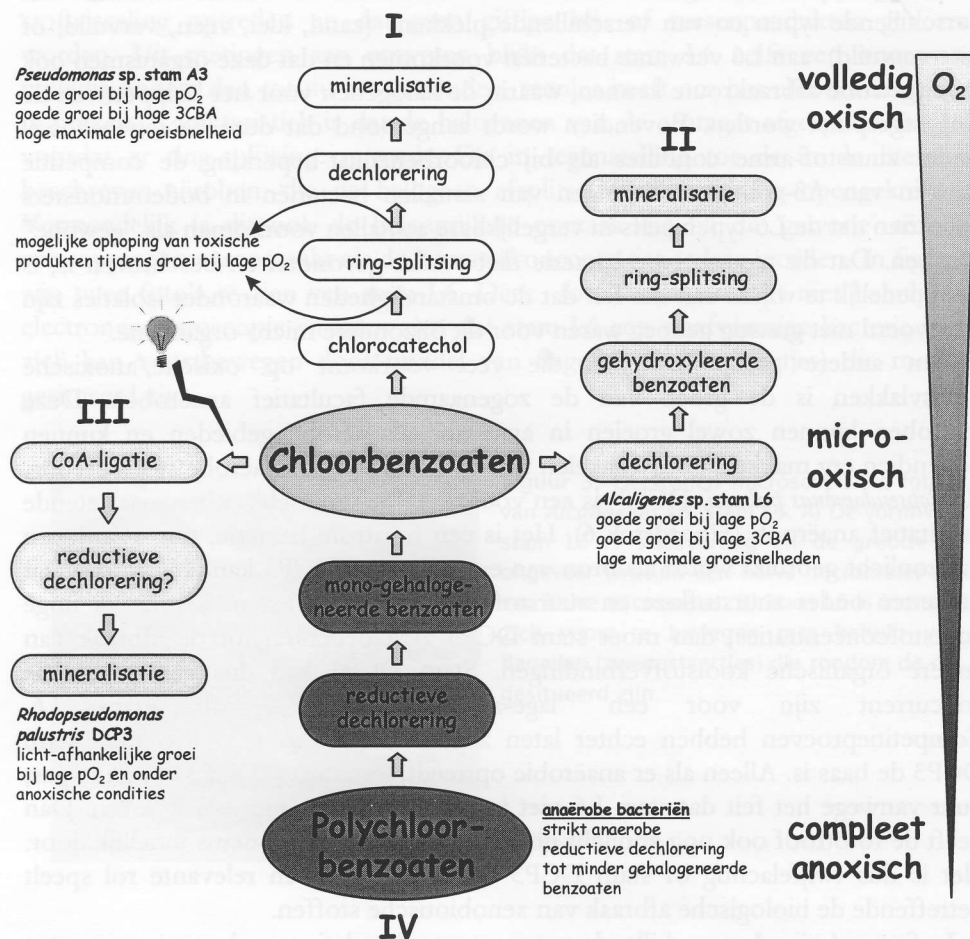
Een andere groep bacteriën die veel voorkomt op oxische/anoxische grensvlakken is de groep van de zogenaamde facultatief anaëroben. Deze microben kunnen zowel groeien in anaërobe als aërobe gebieden en kunnen bovendien erg makkelijk omschakelen tussen de aërobe en anaërobe stofwisseling. *Rhodopseudomonas palustris* DCP3 is een voorbeeld van zo'n chloorbenzooat-etende facultatief anaëroob (Hoofdstuk 6). Het is een fototrofe bacterie, wat wil zeggen dat zonlicht gebruikt wordt als bron van energie. Stam DCP3 kan chloorbenzooat omzetten onder zuurstofloze en zuurstofarme omstandigheden. Komen er hoge zuurstofconcentraties, dan moet stam DCP3 zich beperken tot de afbraak van andere organische koolstofverbindingen. Stam DCP3 kan dus een potentiële concurrent zijn voor een "lage-zuurstofspecialist" zoals stam L6. Competitieproeven hebben echter laten zien dat stam L6 ten allen tijde stam DCP3 de baas is. Alleen als er anaërobie optreedt, komt stam DCP3 er aan te pas, puur vanwege het feit dat stam L6 niet in staat is zonder zuurstof te leven. Dan heeft de fototroof ook nog zonlicht nodig, en dat dringt in bodems moeilijk door. Het is dus twijfelachtig of stam DCP3 wel een ecologisch relevante rol speelt betreffende de biologische afbraak van xenobiotische stoffen.

In figuur 4 zijn de verschillende processen en de relatie van deze processen tot de zuurstofconcentratie in de omgeving in een schema weergegeven.

Wat kunnen we met de verkregen resultaten in de praktijk?

Het is duidelijk dat de verschillende afbraakprocessen van gechloreerde benzoaten en de daarbij horende typen bacteriën alle hun specifieke eisen stellen aan de omgevingscondities om zodoende tot succesvolle afbraak te komen. Als we in een bioreactor gehalogeneerde aromaten willen afbreken, en we kunnen er grote hoeveelheden lucht doorheen blazen, dan lijkt een "gewone" aëroob zoals stam A3 de perfecte kandidaat. Vaak blijkt het echter moeilijk te zijn om de

zuurstofspanning hoog te houden. Dit kan leiden tot ophopingen van giftige producten. Wellicht is het daarom veiliger en bovendien economisch voordeliger om in dit type bioreactoren met L6-achtige organismen te werken. De vaak dure



Figuur 4: Schematische weergave van de verschillende afbraakprocessen en de relatie van deze processen tot de zuurstofconditie in de omgeving, de bacteriën die erbij betrokken zijn en hun belangrijkste ecophysiological karakteristieken. I) de catechol-route, II) de gentisaat-route, III) de licht-afhankelijke afbraakroute en IV) de reductieve route.

en complexe technische applicaties om de zuurstofconcentraties hoog te houden worden dan overbodig. Bovendien kunnen er nog steeds hoge afbraaksnelheden van de milieuvreemde stoffen gehaald worden. Maken we de stap naar de 'on-site (*in situ*)' afbraak - dat is biologische afbraak van milieuvreemde stoffen in de vaak beperkt zuurstof houdende bodem zelf - dan lijkt ook het L6-type bacterie de

perfecte kandidaat. Waarom? Omdat meerdere halogenen aanwezig zijn voor een stapsgewijze afbraak van het aantal halogenen. De aanwezigheid van anaërobe bacteriën. De gehalogeneerde aromatische stoffen worden afgebroken door bacteriën zoals stam L6. Het is echter een zodanig hoge zuurstofspanning van de anaërobe bacteriën een samenwerkende biologische afbraak van de anaërobe fototroof mogelijk. Het is samen met strikt anaërobe bacteriën, die zuurstofconcentraties in de bodem doorzichtig moeten zijn, om de fototrofen te voldoende

De conclusies van het

- 1) Anaërobe bacteriën kunnen chloorbenzooat met succes afbreken.
- 2) Onder lage zuurstofspanningen spelen bij de afbraak van chloorbenzooat verschillende afbraakroutes, waarvoor verschillende ring worden afgesplitst tegen ophopingen van chloorbenzooatconcentraties.
- 3) De "lage-zuurstofspanning" is zowel onder micro-oxische als onder volledig anoxische condities.
- 4) De "lage-zuurstofspanning" is algemeen voor te komen bij de afbraak van chloorbenzooat.
- 5) De "lage-zuurstofspanning" is opzichte van facultatief anaërobe bacteriën in zuurstofarme condities.

perfekte kandidaat. Wanneer we te maken hebben met vervuulende stoffen waar meerdere halogenen aan de aromatische ring vast zitten, dan moet vermoedelijk voor een stapsgewijze aanpak gekozen worden. Dat betekent dat in eerste instantie het aantal halogenen verlaagd moet worden door biologische activiteit van anaërobe bacteriën. De eindprodukten van zulke anaërobe processen, de minder gehalogeneerde aromaten, zijn vervolgens een goed substraat voor aërobe bacteriën zoals stam L6 of stam A3. Voor activiteit van A3-type bacteriën moet echter een zodanig hoge zuurstofconcentratie aanwezig zijn, dat de stofwisseling van de anaërobe bacteriën geremd kan worden. Het lijkt daarom wenselijk L6-type bacteriën een samenwerkingsverband aan te laten gaan met de anaëroben. Voor biologische afbraak van hoger gehalogeneerde verbindingen zou een facultatief anaërobe fototroof mogelijk een uitermate veilige kandidaat zijn om in bioreactors samen met strikt anaëroben gekweekt te worden. De aanwezigheid van zelfs lage zuurstofconcentraties is dan niet meer nodig. De bioreactoren zullen wel doorzichtig moeten zijn en belicht moeten worden, om aan de energiebehoefte van de fototrofen te voldoen.

De conclusies van het onderzoek op een rijtje:

- 1) Anaërobe bacteriën kunnen een dichloorbenzooat omzetten tot een chloorbenzooat met nog maar één chlooratoom.
- 2) Onder lage zuurstofspanningen blijken andere typen bacteriën een rol te spelen bij de afbraak van monochloorbenzooat. Deze bacteriën bezitten unieke afbraakroutes, waar de halogenen al voor het openknippen van de aromatische ring worden afgesplitst. Vermoedelijk zijn deze bacteriën hierdoor beschermd tegen ophopingen van giftige tussen- of bijprodukten ten tijden van zuurstofschaarste.
- 3) De "lage-zuurstofspecialisten" winnen de competitie van de niet-specialisten, zowel onder lage zuurstofconcentraties, als ook bij lage chloorbenzooatconcentraties.
- 4) De "lage-zuurstofspecialisten" met de aangepaste stofwisseling blijken algemeen voor te komen in de natuur.
- 5) De "lage-zuurstofspecialisten" hebben ook een competitief voordeel ten opzichte van facultatief anaërobe fototrofe bacteriën, die ook onder zuurstofarme condities chloorbenzooaten kunnen afbreken.